

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lajos Gáthy

Rekombinantní exprese a purifikace C324S modifikované
nitrilasy z *Arthrodermy benhamiae*

Recombinant expression and purification of the C324S
modified nitrilase from *Arthroderma benhamiae*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 6. srpna 2014

Podpis:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení práce a spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce. Mé poděkování patří též Mgr. Janu Bláhovi za cenné rady, věcné připomínky a ochotu, kterou mi při vypracování této práce věnoval.

Abstrakt

Studovaný enzym je C324S modifikovaná rekombinantní nitrilasa z *Arthroderma benhamiae* CBS 112371 (GenBank: EFE30690). Rekombinantní forma tohoto enzymu připravená již dříve Mgr. Janem Bláhou byla analyzována za použití hmotnostní spektrometrie s ohledem na zapojení disulfidických můstků. Z naměřených hodnot vyplývá, že se na C-konci enzymu nachází nepárový cystein 324, který se váže nespecificky na ostatní cysteiny v sekvenci proteinu a vzniká tak heterogenní směs disulfidicky vázaných oligomerů proteinu.

Mutací genu kódujícího nativní formu této nitrilasy tak byla připravena mutantní forma nahrazující cystein 324 za serin. Gen byl zaklonován do plasmidu pET-30a (+) a exprimován pomocí takto upraveného plasmidu v bakteriích *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) a získaný produkt byl následně purifikován za použití iontově výměnné chromatografie a gelové filtrace.

Oligomerní chování proteinu bylo zkoumáno za použití elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu, gelové filtrace a analytické ultracentrifugace, a to jak v neredukujících, tak v redukujících prostředích.

Klíčová slova: rekombinantní exprese, nitrilasa, *Arthroderma benhamiae*, kapalinová chromatografie

Abstract

The examined enzyme is C324S modified recombinant nitrilase from *Arthroderma benhamiae* CBS 112371 (GenBank: EFE30690). A recombinant form of this enzyme previously prepared by Mgr. John Blaha was analyzed using mass spectrometry with respect to disulfide bond pattern. The obtained data shows that on the C-terminus of the enzyme is an unpaired cysteine 324, which binds nonspecifically to other cysteines in the sequence of the protein leading to a heterogeneous mixture of disulfidic oligomers.

Mutated form of the gene encoding the native form of this nitrilase was prepared by replacing cysteine 324 to serine and cloned into the plasmid pET-30a (+). The gene was expressed using the modified plasmid in *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) and the resulting product was subsequently purified using ion exchange chromatography and gel filtration.

Oligomeric behaviour of the protein was examined using electrophoretic separation in polyacrylamide gels, gel filtration and analytical ultracentrifugation, both in non-reducing and reducing environment conditions.

Keywords: recombinant expression, nitrilase, *Arthroderma benhamiae*, liquid chromatography

Obsah

1. Úvod.....	9
1.1. Nitrilasy	9
1.2. Struktura nitrilas	10
1.3. <i>Arthroderma benhamiae</i>	11
1.4. Enzym NitAB C324S.....	12
2. Cíle práce	13
3. Materiály.....	14
3.1. Bakteriální kmeny a buněčné linie	14
3.2. Chemikálie.....	14
3.3. Roztoky	15
3.4. Přístroje a pomůcky	16
4. Metody.....	19
4.1. Transformace kompetentních buněk	19
4.2. Produkce rekombinantní nitrilasy v buňkách <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3).....	19
4.3. Purifikace proteinu	20
4.3.1. Příprava pelety	20
4.3.2. Ionově výměnná chromatografie na koloně Q-Sepharose.....	20
4.3.3. Zakoncentrování proteinu	21
4.3.4. Gelová permeační chromatografie	21
4.4.1. Elektroforéza v prostředí SDS	21
4.4.2. Sedimentační analýza v analytické ultracentrifuze.....	22
5. Výsledky	24
5.1. Rekombinantní exprese NitAB C324S	24
5.2. Purifikace proteinu	24

5.3. Sedimentační analýza	28
6. Diskuse	30
7. Závěr	31
8. Seznam použité literatury	32

Seznam použitých zkratek

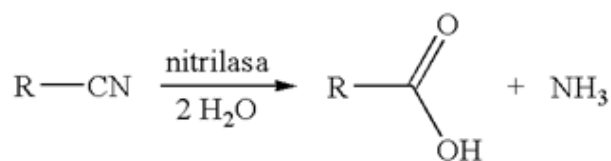
AA	akrylamid
APS	peroxosíran amonný (ammonium persulfate)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
NitAB	Přirozená varianta nitrilasy z <i>Arthroderma benhamiae</i>
NitAB C324S	C324S modifikovaná nitrilasa z <i>Arthroderma benhamiae</i>
dH ₂ O	deionizovaná voda
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FPLC	rychlá proteinová chromatografie (fast liquid chromatography)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipeazinethansulfonová
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	médium dle Luria Bertaniho
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfan
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TES	Tris pufrovaný fyziologický roztok obsahující EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Úvod

1.1. Nitrilasy

Nitrilasy (jinak též nitrilaminohydrolasy) jsou řazeny do první skupiny nitrilasové superrodiny, numerickým klasifikačním schématem jsou označeny jako EC 3.5.5.1. I přes historické dělení patří nitrilasy mezi jediné známé enzymy této superrodiny, které mají nitrilasovou aktivitu [1]. Výskyt těchto enzymů byl zdokumentován v mnoha druzích vláknitých hub, které jsou předmětem dalšího výzkumu [2, 3].

Tyto enzymy jsou zajímavé tím, že dokáží ve vodném roztoku za neutrálních hodnot pH a laboratorní teploty převést nitril na odpovídající karboxylovou kyselinu a amoniak, bez vzniku amidů či jiných produktů (obr. 1). Tuto vlastnost vykazují i některé mutantní varianty nitrilas [4].



Obr. 1: Nitrilasová aktivita enzymu [4].

Nitrilasy lze dělit do tří tříd dle substrátové specifity [5] na ty, které hydrolyzují:

- alifatické nitrily
- aromatické nitrily
- arylacetonitrily

Velká pozornost byla dříve věnována nitrilasám hub z rodu *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gibberella* a *Penicillium* [6]. Tyto enzymy jsou používány především k hydrolyzaci indol-3-acetonitrilu na indol-3-octovou kyselinu, přírodní auxin (fytormon) s širokým využitím na rostlinách [7].

Další známou aplikací je produkce akrylamidu z akrylnitrilu, či použití některých nitrilas k převedení racemické směsi na jeden konkrétní enantiomer dané molekuly [8].

1.2. Struktura nitrilas

Proteiny nitrilasové superrodiny jsou charakteristické $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$ uspořádáním polypeptidových podjednotek, což bylo prokázáno například vyřešením krystalové struktury bakteriální N-karbamyl-D-aminokyselina-amidohydrolasy (obr. 2) [1, 9].



Obr. 2: Struktura N-karbamyl-D-aminokyselina-amidohydrolasy (PDB 1FO6). Krystalová struktura proteinu tvořená čtyřvrstvou $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$ strukturou. Vnější hydrofilní struktura s dlouhým C-koncovým fragmentem se spojuje s dalším monomerem za vzniku malé hydrofobní dutiny. Místně cílená mutagenese His129, His144 a His215 odhalila základní geometrické uspořádání těchto struktur s cílem udržet stabilní konformaci aktivního místa proteinu s charakteristickou sekvencí Glu 47, Lys 127 a Cys 172 [10].

Tyto proteiny, jejichž varianty jsou druhově specifické, jsou obvykle složeny z jednoho typu podjednotek o molekulové hmotnosti 32 až 45 kDa [11]. V případě NitAB C324S (C324S modifikovaná nitrilasa z *Arthroderma benhamiae*) byla molekulová hmotnost vypočtena teoreticky na 35,5 kDa. Některé nitrilasy jsou aktivní v monomerní formě, například nitrilasa z *Rhodococcus rhodochrous*, jiné vykazují aktivitu ve formě komplexů o více podjednotkách, například enzym z vláknité houby *Fusarium solani* tvoří oktamer [2, 12].

Nitrilasy obsahují charakteristickou sekvenci aminokyselin Glu-Lys-Cys, triádu odpovědnou za katalytickou aktivitu enzymu v aktivním místě [13, 14]. Cystein v aktivním místě je klíčový pro enzymovou aktivitu proteinu. Mutací tohoto cysteinu byla zjištěna úplná ztráta katalytické aktivity u *Alcaligenes faecalis* a *Arabidopsis thaliana* [15]. Specifita konkrétní nitrilasy pak úzce souvisí s její primární strukturou. Z výzkumu aminokyselinových sekvencí plyne, že i druhově odlišné nitrilasy, se stejnou enzymovou specifitou, vykazují mnoho fylogenetických podobností právě v primární struktuře proteinu [16].

1.3. *Arthroderma benhamiae*

Systematicky je *Arthroderma benhamiae* řazena do [17]:

říše Houby

podříše *Dikarya*

kmen *Ascomycota*

třída *Eurotiomycetes*

podtřída *Eurotiomycetidae*

řád *Onygenales*

rod *Arthroderma*

druh *Arthroderma benhamiae*

Arthroderma benhamiae je název pro teleomorfní formu houby (tj. houba ve fázi pohlavního rozmnožování), v anamorfní (tj. imperfektní formě) je tato houba nazývána *Trichophyton mentagrophytes*. Sekvenace genomu *A. benhamiae* byla dokončena roku 2009, délka jejího genomu je 22,3 Mb (GenBank: ABSU000000000) [18].

Jedná se o dermatofytickou houbu, která využívá jako zdroj uhlíku i dusíku keratin, způsobuje proto infekce kůže, nehtů a vlasů [19]. Některé druhy *Trichophyton* napadají výhradně zvířata a drobné hlodavce, nejčastějšími hostiteli bývají morčata (např. *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*). Jiné způsobují infekce výhradně u lidí (např. *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*). Odhaduje se, že až 30% populace je nakaženo dermatofyty, přičemž diagnostika i terapie těchto infekcí jsou velmi obtížné [20, 21]

1.4. Enzym NitAB C324S

Studovaný enzym je mutovaná rekombinantní nitrilasa z *Arthroderma benhamiae* CBS 112371 (GenBank: EFE30690) (obr. 3). Mutace byla provedena Mgr. Janem Bláhou na NitAB (divoká varianta nitrilasy z *Arthroderma benhamiae*) pomocí metody OE-PCR (z angl. overlap extension polymerase chain reaction) [22]. Gen pro tento upravený protein byl vložen do plasmidu pET-30a(+).

A) NitAB, 335 aminokyselin

MSGPALKVAITQAQPKWLDLAGSVEKTVNLIAEAAKGDARLVAFPECW
IPGYPGWIWQRPVDPIITKYIQNSLSVNSAEMNTIKSAAKENNIAVVLGFV
EAIDTHSVYIAQAIISPKGELLMHRRKIKPTHMETVFGDGSGLTNVAD
VDFGGDIGVVKVGTLCWEHALPLLKYHTYSQKEAIIHAMWPPIDPHPG
VAPALWSMSAEGCQNLSQTHAIEGGAYVLHCTAVCNEEGIEGMKTKGG
LLFQEPGGGHSAAIAGRRLTKPLADGNPAAEGIVYADLDMARVVMNKG
FIDVVGHYSRPDLLWLGVDKAQKGCVVPKREPEQDV

B) NitAB C324S, 335 aminokyselin

MSGPALKVAITQAQPKWLDLAGSVEKTVNLIAEAAKGDARLVAFPECW
IPGYPGWIWQRPVDPIITKYIQNSLSVNSAEMNTIKSAAKENNIAVVLGFV
EAIDTHSVYIAQAIISPKGELLMHRRKIKPTHMETVFGDGSGLTNVAD
VDFGGDIGVVKVGTLCWEHALPLLKYHTYSQKEAIIHAMWPPIDPHPG
VAPALWSMSAEGCQNLSQTHAIEGGAYVLHCTAVCNEEGIEGMKTKGG
LLFQEPGGGHSAAIAGRRLTKPLADGNPAAEGIVYADLDMARVVMNKG
FIDVVGHYSRPDLLWLGVDKAQKGSVVPKREPEQDV

Obr. 3: Primární struktura enzymu: A) NitAB (nativní forma), 335 aminokyselin; B) NitAB C324S (modifikovaná forma), 335 aminokyselin. **Žlutě** jsou zvýrazněny všechny cysteiny v primární struktuře, **červeným** písmem je označen cystein v aktivním místě enzymu. **Modře** je pak zvýrazněna mutace cysteinu 324 za serin.

2. Cíle práce

- V bakteriích *E. coli* BL21-Gold (DE3) heterologně exprimovat mutantní variantu nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* mající na C-konci na pozici 324 serin namísto cysteinu.
- Takto připravený protein purifikovat za použití anexové a gelové permeační chromatografie.
- Charakterizovat purifikovaný protein v redukujícím i neredukujícím prostředí a popsat jeho oligomerní stav.

3. Materiály

3.1. Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	<i>Stratagene</i> , USA
pET30a(+)_NitAB C324S	Mgr. Jan Bláha, Katedra biochemie PřF UK Praha

3.2. Chemikálie

Agar	<i>Oxoid</i> , Anglie
Agarosa	<i>Sigma</i> , USA
Akrylamid	<i>Sigma</i> , USA
APS	<i>Serva</i> , USA
Azid sodný	<i>Serva</i> , USA
BSA	<i>New England Biolabs</i> , USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva</i> , USA
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad</i> , Německo
DTT	<i>Serva</i> , USA
EDTA	<i>Jersey Lab Supply</i> , USA
Glycerol	<i>Lach-Ner</i> , ČR
HEPES	<i>Sigma</i> , USA
Chlorid sodný	<i>Lach-Ner</i> , ČR
IPTG	<i>Serva</i> , USA

Kanamycin	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
Kvasničný extrakt	<i>Serva, USA</i>
Leupeptin	<i>Sigma, USA</i>
Lysozym	<i>Sigma, USA</i>
PMSF	<i>Serva, USA</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
TCEP	<i>Sigma, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
Tris	<i>Roth, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, Anglie</i>

3.3. Roztoky

LB agar: 1,5 % agar v LB médiu

LB médium: 1 % trypton; 0,5 % kvasničný extrakt; 1 % NaCl; pH = 7,4

Roztoky pro SDS-PAGE:

AA: 30 % akrylamid, 1 % N,N'-methylen-bis-akrylamid

Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45 % methanol; 10 % kyselina octová; 0,25 % CBB R-250

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE: 10 × koncentrovaný: 3 % Tris; 14,4 % glycin; 1 % SDS; pH = 8,3

Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu: 35 % ethanol; 10 % kyselina octová

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující: 2 × koncentrovaný: 100 mM Tris; 20 % glycerol; 4 % SDS; 0,2 % bromfenolová modř; 100 mM DTT; pH = 6,8

Pufry pro ionexovou chromatografii na Q-Sepharose:

TES pufr: 10 mM Tris; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 10 mM NaN₃; pH = 8,0

Pufr A: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaN₃; pH = 8,0

Pufr B: 25 mM Tris; 500 mM NaCl; 10 mM NaN₃; pH = 8,0

Pufry pro gelovou chromatografii:

Tris (neredukující): 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaN₃; pH = 8,5

Tris (redukující): 20 mM Tris; 150 mM NaCl; 10 mM NaN₃; 5 mM TCEP; pH = 8,5

3.4. Přístroje a pomůcky

Analytická ultracentrifuga Proteomelab XL-I	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Analytické váhy	<i>AND, USA</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z H+P	<i>Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Discovery	<i>HTL, Polsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra™ X-22	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga EBA 12 R	<i>Hettich, Německo</i>
Centrifuga 5415 R	<i>LAB MARK, ČR</i>
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Čtečka mikrotitračních destiček Sunrise	<i>Tecan, USA</i>

Filtry pro sterilizaci PES 0,22 µm	<i>BioTech, ČR</i>
FPLC systém ÄKTA prime plus	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
Inkubátor IR 1500	<i>LABsystem, ČR</i>
Kahan	<i>závod Votice, ČR</i>
Kolona Superdex™ 200 10/300 GL	<i>Amersham Bioscience, Švédsko</i>
Kolona Q-Sepharose Fast Flow	<i>GE Healthcare, USA</i>
Koncentrátory Amicon Ultra	<i>Millipore, USA</i>
Laminární box Clean Air Techniek	<i>B.V. PMV, Nizozemí</i>
Magnetická míchačka MM A2	<i>Lab. přístroje Praha, ČR</i>
Mikrostříkačka	<i>Hamilton, USA</i>
Mrazicí box (-20 °C)	<i>Calex, ČR</i>
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	<i>Sanyo, Japonsko</i>
NanoVue Plus	<i>GE Healthcare, USA</i>
pH-metr 3310	<i>Jenway, UK</i>
Předvážky KB 1200-2	<i>Kern, Německo</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Ultrazvuková sonda Sonopuls SH 70G	<i>Bandelin, Německo</i>
UV/VIS spektrometr UV4 Series	<i>UNICAM, UK</i>
Vařič	<i>ETA, ČR</i>

Třepačka ORBI_SAFE TS NetWise

Gallenkamp, Německo

Vodní lázeň TW2

Julabo, Německo

Zdroj napětí PS 251-2

Sigma-Aldrich, USA

4. Metody

4.1. Transformace kompetentních buněk

Pro transformaci buněk byla použita metoda tepelného šoku. Kompetentní buňky jsou uchovávány na ledu a po přidání plasmidu jsou pak vystaveny na krátkou chvíli ohřevu. Plasmatická membrána tak vytvoří póry, kterými je umožněn vstup plasmidu do bakterie.

Z mrazícího boxu ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) byly kompetentní buňky *Escherichia coli* kmene BL21-Gold (DE3) v objemu $200\text{ }\mu\text{l}$ přemístěny do ledové lázně k rozmrznutí. Obsah alikvoty byl krátce promíchán na vortexu a následně rozdělen do dvou mikrozkušavek po $50\text{ }\mu\text{l}$. Ke každé části bylo přidáno $10\text{ }\mu\text{l}$ plasmidu pET-30a(+) NitAB C324S, jehož koncentrace byla stanovena na $32,5\text{ ng}/\mu\text{l}$, a takto byla směs inkubována v ledové lázni po 30 min. Následovalo ohřátí 1 min ve vodní lázni o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, po němž byla směs opět vrácena na led na 10 min. Do každé alikvoty byl přidán 1 ml LB média (médium dle Luria Bertaniho) o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po krátkém promíchání na vortexu byly alikvoty umístěny na 1 hod do inkubátoru vyhřátého na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Suspenze byla následně odstředěna 2 min při $2000 \times G$. Většina supernatantu byla odstraněna a ve zbylých cca $100\text{ }\mu\text{l}$ byly vzniklé pelety resuspendovány a následně přeneseny na Petriho misky s LB agarem obsahujícím kanamycin o koncentraci $50\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$. Misky byly umístěny na 16 hod do inkubátoru vyhřátého na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Produkce rekombinantní nitrilasy v buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3)

Z narostlých kolonií byla vybrána vždy jedna kolonie, která byla pomocí sterilní špičky přenesena v laminárním boxu do 5 ml zkumavek s víčkem s 5 ml LB média s kanamycinem o koncentraci $50\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$. Takto připravené bakteriální kultury byly umístěny na 16 hod do třepačky vyhřáté na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 220 ot.min^{-1} .

Následujícího dne byl obsah každé zkumavky v laminárním boxu převeden do 2l Erlenmeyerových baněk s 500 ml LB média a antibiotikem.

Kultury byly následně inkubovány na orbitální třepačce při 220 ot.min⁻¹, dokud nebylo dosaženo optické hustoty při 500 nm v rozmezí 0,8 až 1 proti LB médiu. Z každé Erlenmeyerovy baňky byl odebrán 1 ml vzorku na SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza v prostředí SDS) a přidáním IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) do celkové koncentrace 0,5 mM byla indukována exprese proteinu. Kultivace pokračovala za stejných podmínek na orbitální třepačce dalších 16 hod při 20 °C. Po této době byl z každé baňky odebrán kontrolní vzorek na SDS-PAGE a zbytek produkce byl centrifugací v 250 ml kyvetách 20 min při 4500 \times g sklizen. Pelety byly následně resuspendovány v 20 ml TES pufru (Tris pufrovaný fyziologický roztok obsahující EDTA) a znovu centrifugovány po dobu 15 min při 4500 \times g. Po odstranění supernatantu byla jedna z pelet ihned použita k purifikaci a ostatní pelety byly umístěny do mrazicího boxu při -20 °C.

4.3. Purifikace proteinu

4.3.1. Příprava pelety

Z mrazicího boxu byla peleta vyjmuta a volně rozmražena při laboratorní teplotě. K resuspendování pelety byl použit pufr A s přídavkem 4 mg lysozymu a inhibitorů proteas (1 μ M leupeptin, 1 mM PMSF a 10 mM EDTA). Po 30 min inkubace byla provedena homogenizace buněk působením UZ sondy s opakováním 4 \times 1 min při 40 % amplitudě a pulsu 0,5 s. Směs byla po celou dobu chlazena v ledové lázni.

Lyzované buňky byly poté rozděleny do dvou 30 ml centrifugačních zkumavek Oak Ridge a centrifugovány 10 min při 15300 \times g. Supernatant byl následně převeden do sterilních 50 ml zkumavek a zfiltrován přes filtr s póry o velikosti 0,22 μ m.

4.3.2. Ionově výměnná chromatografie na koloně Q-Sepharose FF

Anexová chromatografie byla provedena na přístroji FPLC ÄKTAprime plus. Vzorek byl nanášen s použitím 150 ml smyčky (tzv. Superloop) na kolonu Q-Sepharose Fast Flow při průtoku 5 ml.min⁻¹. Promytím pufr A se odstranily nečistoty a nenavázané složky, pak byla provedena eluce lineárním gradientem NaCl v pufru B rychlostí 3 ml.min⁻¹ s délkou gradientu 180 ml. Jednotlivé frakce

byly jímány do 15 ml sterilních zkumavek a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.3.3. Zakoncentrování proteinu

Jímané frakce byly zakoncentrovány za použití membránových koncentrátorů Amicon Ultra na centrifuze při otáčkách $4500 \times g$ a teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na výsledných 500 μl . Činidlem dle Bradfordové byla kontrolována zvyšující se koncentrace proteinu, která byla následně stanovena spektrofotometricky s použitím roztoků BSA o známé koncentraci jako kalibračních standardů na 1 mg/ml. Zároveň s tím bylo stejnou metodou ověřeno, že protein nepronikl membránou do filtrátu.

4.3.4. Gelová permeační chromatografie

Gelová chromatografie byla provedena na přístroji FPLC ÄKTAprime plus. Vzorek byl nanášen s použitím mikrostříkačky Hamilton na kolonu Superdex200 10/300 GL při průtoku $0,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Smyčka o objemu 500 μl byla promyta za použití stříkačky mobilní fází, do smyčky byl následně nanesen zakoncentrovaný vzorek o objemu cca 400 μl . Eluce byla provedena pomocí předem nastavené metody s automatickým nástřikem vzorku na kolonu. Jednotlivé frakce byly jímány do sterilních eppendorfek a následně analyzovány za použití SDS-PAGE.

4.4. Charakterizace připravených proteinů

4.4.1. Elektroforéza v prostředí SDS

K charakterizaci proteinů byla použita elektroforéza v prostředí dodecylsírany sodného (SDS) v polyakrylamidovém gelu. Proteiny o různé elektroforetické pohyblivosti jsou tak ve stejnosměrném elektrickém poli separovány dle délky, konformace a náboje proteinu.

Příprava všech vzorků pro SDS-PAGE probíhala vždy stejně a v neredukujícím prostředí. Do vzorku o objemu 10 μl bylo přidáno 10 μl $2 \times$ koncentrovaného neredukujícího nebo redukujícího pufru, dle druhu prováděné chromatografie. Směs byla následně 5 min povařena ve vodní lázni a

krátce centrifugována. Do jamek zaostřovacího gelu bylo aplikováno vždy 10 µl takto připraveného vzorku.

Do držadla byla upevněna skla, mezi něž byl nejprve nanesen separační gel (tab. 1). Gel byl převrstven dH₂O a ponechán 10 min polymerovat. Po odstranění vody byl nanesen zaostřovací gel (viz. tabulka č.1), do něhož byl umístěn 10-ti jamkový hřeben. Hřeben byl po dalších 10-ti minutách vyjmut a dle návodu byla sestavena aparatura. Do elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr.

Elektroforéza byla provedena při napětí 200 V po dobu 55 – 60 min. Gel byl poté opatrně vyjmut, vložen do barvicího roztoku pro SDS-PAGE a nakonec odbarven v odbarovací lázni.

Tab. 1: Složení zaostřovacího a 15% separačního polyakrylamidového gelu (rozpis objemů na jeden gel).

Separační gel		Zaostřovací gel	
Látka	V [ml]	Látka	V [ml]
dH ₂ O	0,9	dH ₂ O	0,7
30 % AA	2,0	30 % AA	0,25
1,5M Tris, pH = 8,8	1,0	0,5M Tris, pH = 6,8	0,13
TEMED	0,02	TEMED	0,0015
10 % SDS	0,04	10 % SDS	0,01
10 % APS	0,04	10 % APS	0,01

4.4.2. Sedimentační analýza v analytické ultracentrifuze

Oligomerní stav enzymu, jeho homogenita a také agregace byla stanovena pomocí sedimentační analýzy. Primárním výsledkem sedimentačně rychlostního experimentu je přesná hodnota sedimentačního koeficientu molekuly, ze které lze dále usuzovat její tvar a velikost [23].

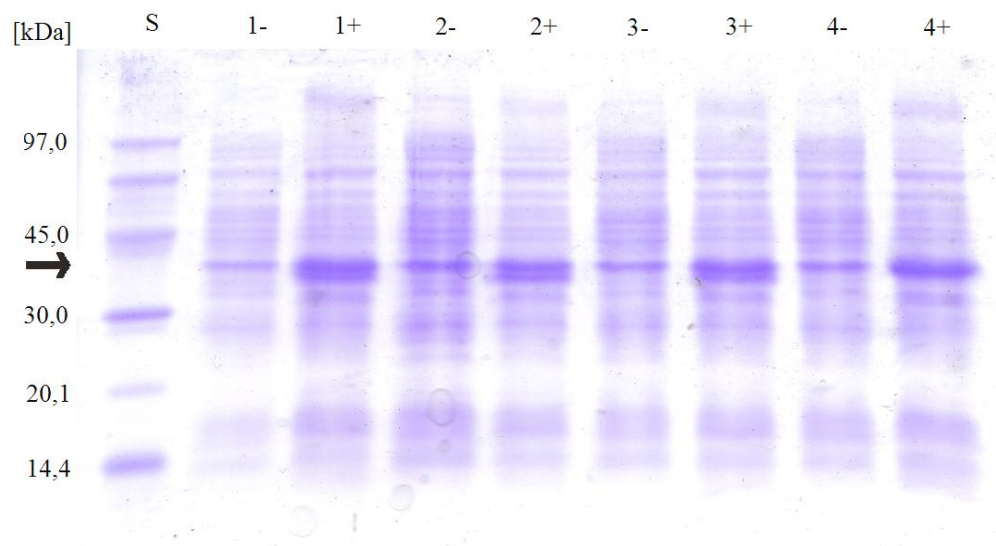
Měření proběhlo na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (rotor An50Ti) a provedl ho včetně vyhodnocení výsledků RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D. Vzorek NitAB C324S po gelové filtraci o objemu 450 μl byl doplněn 50 μl 50 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)fosfan) upraveným tuhým Tris pufrem na $\text{pH} = 8,0$. Do kyvety bylo vždy pipetováno 400 μl vzorku proteinu a 420 μl pufru jako reference. Měření probíhalo nejprve při 42000, resp. 30000 ot.min^{-1} a 20 °C. Sedimentace vzorku byla sledována absorpční optikou při vlnové délce 280 nm a bylo sbíráno 100 snímků po 5 min (pro 42000 ot.min^{-1}), resp. 120 snímků po 10 min (pro 30000 ot.min^{-1}). Hustota a viskozita použitého pufru, stejně jako parciální specifické objemy analyzovaných vzorků byly predikovány za pomoci programu SEDNTERP [24] a získaná data byla následně vyhodnocena s využitím programu SEDFIT [25] a SEDPHAT [26].

5. Výsledky

Práce se zabývá C324S mutantní nitrilasou z *Arthroderma benhamiae* (NitAB C324). Sekvence tohoto konstruktů a nativní formy jsou uvedeny na obr. 1, str. 12. Mutovaný konstrukt proteinu byl vložen do expresního plasmidu pET-30a(+).

5.1. Rekombinantní exprese NitAB C324S

Produkce proteinu proběhla dle popisu v kapitole 4.4. v kompetentních buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3). K indukci exprese v okamžiku exponenciálního množení buněk byl použit IPTG o výsledné koncentraci 0,5 mM, čímž byla zahájena produkce NitAB C324S o velikosti 35,5 kDa (obr. 4).

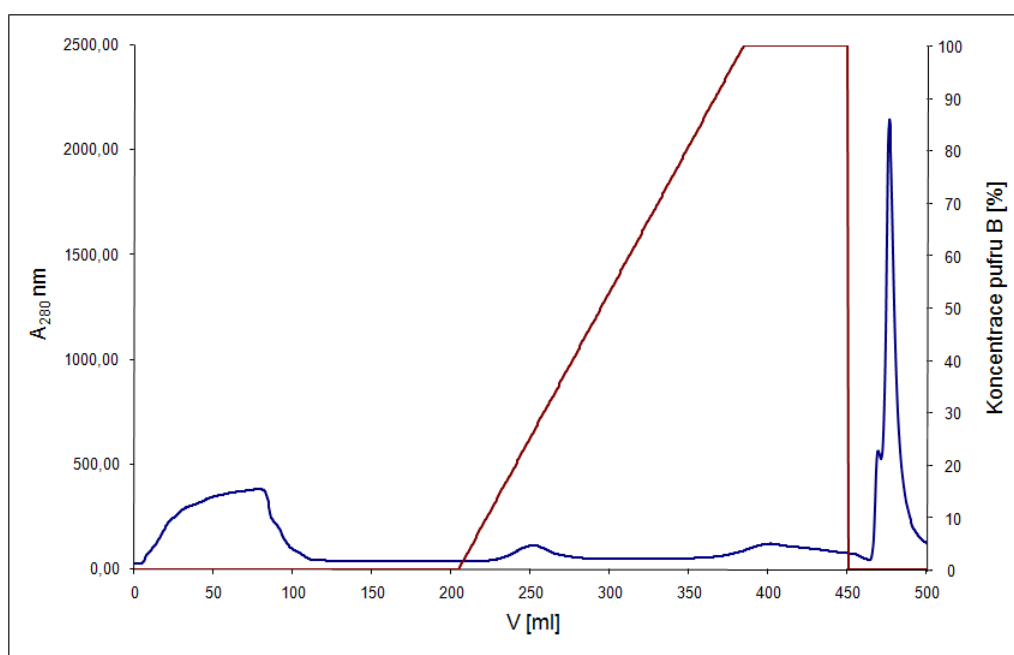


Obr. 4: SDS-PAGE v 15% separačním gelu exprese nitrilasy v buňkách *E. coli* BL21-Gold (DE3). V dráze označené písmenem "S" je standard. V drahách označených číslem a záporným znaménkem jsou buňky před inkucí IPTG. V drahách označených čísly s kladným znaménkem jsou buňky po indukci.

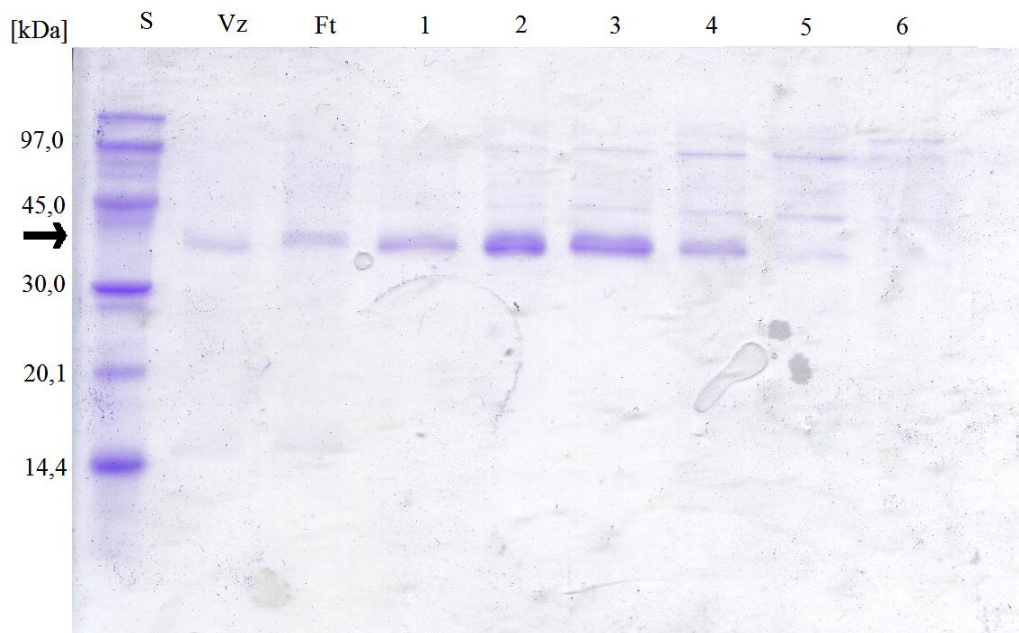
5.2. Purifikace proteinu

Peleta z produkce proteinu byla dle kapitoly 4.3.1. resuspendována v pufru A o pH = 8,0 a přidavkem inhibitorů a lysozymu. V tomto prostředí má studovaný enzym s teoreticky spočítanou hodnotou pI = 5.88 celkový záporný

náboj. Z purifikačního protokolu převzatého od kolegyně Mgr. Ivety Hradilové plyne, že nebyly pozorovány větší rozdíly v chování redukované a neredukované formy nativního proteinu. Z tohoto důvodu byl v prvním kroku zvolen pufr bez obsahu redukčního činidla a purifikace proběhla za použití anexové chromatografie na koloně Q-Sepharose Fast Flow. Dle kapitoly 4.3.2. byla provedena lineární gradientová eluce pufrem B (obr. 5), přičemž přítomnost NitAB C324S u jímáné frakce (obr. 5) byla následně ověřena na pomoci SDS-PAGE (obr. 6, str. 26)

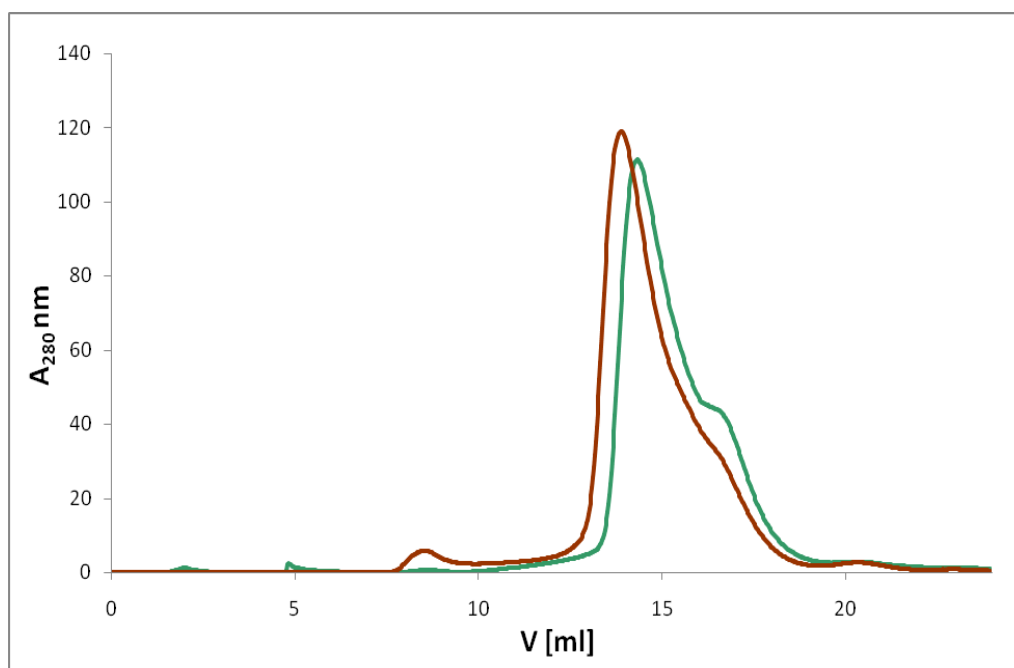


Obr. 5: Průběh anexové chromatografie NitAB C324S na koloně Q-Sepharose Fast Flow. **Modrá** křivka je záznam absorbance nitrilasy při 280 nm. Jímáný eluční vrchol má vrchol ve 250 ml a byl jímán do 4×15 ml zkumavek (frakce 1 – 4 na obr. 6, str. 26). **Hnědou** barvou je zaznamenána koncentrace pufru B při gradientové eluci.

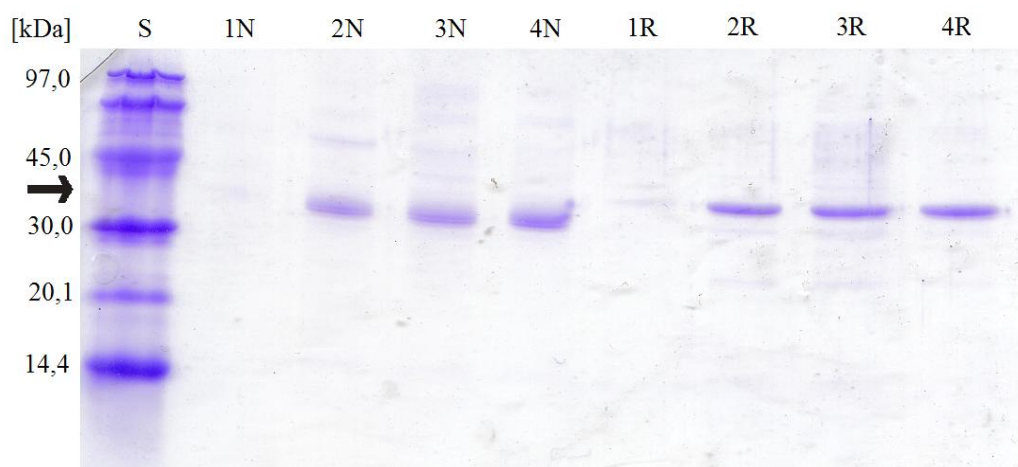


Obr. 6: SDS-PAGE v 15% separačním gelu po anexové chromatografii na Q-Sepharose Fast Flow. V dráze označené písmenem "S" je standard. V dráze označené zkratkou "Vz" se nachází nanášený vzorek (připravený dle kapitoly 4.3.1.), v dráze označené "Ft" je jímaný průtok. Frakce označené čísly 1 – 4 obsahují eluční vrchol (v retenčním objemu cca 250 ml) a frakce označené čísly 5 – 6 pak obsahují druhý eluční vrchol (v retenčním objemu cca 400 ml).

Jak dokládá obrázek 6, frakce 1. a 2. měly relativně nejvyšší čistotu, pro další práci byly proto zakoncentrovány dle kapitoly 4.3.3. vždy z 10 ml na 400 μ l. Následně byla provedena gelová filtrace (kapitola 4.3.4.) v případě frakce 1 v neredukujícím a v případě frakce 2 v redukujícím prostředí (obr. 7, str. 27). Jímané frakce byly opět ověřeny pomocí SDS-PAGE (obr. 8, str. 27).



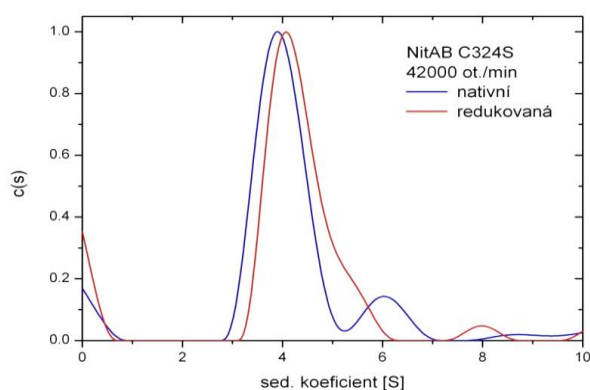
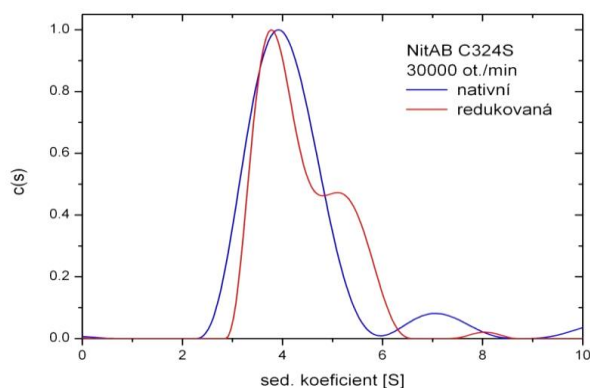
Obr. 7: Záznam z gelové filtrace na koloně Superdex 200 10/300 GL. Zelená křivka zobrazuje neredukovaný vzorek, hnědá redukovaný vzorek. Nánášeno bylo vždy 500 μ l vzorku.



Obr. 8: SDS-PAGE v 15% separačním gelu po chromatografii na koloně Superdex 200 10/300 GL. V dráze označené písmenem "S" je standard. Eluční vrchol byl vždy jímán do $4 \times 1,5$ ml mikrozkušavek. Jednotlivé frakce jsou označeny čísly 1 – 4 a písmenem "N" u neredukujícího a "R" redukujícího prostředí.

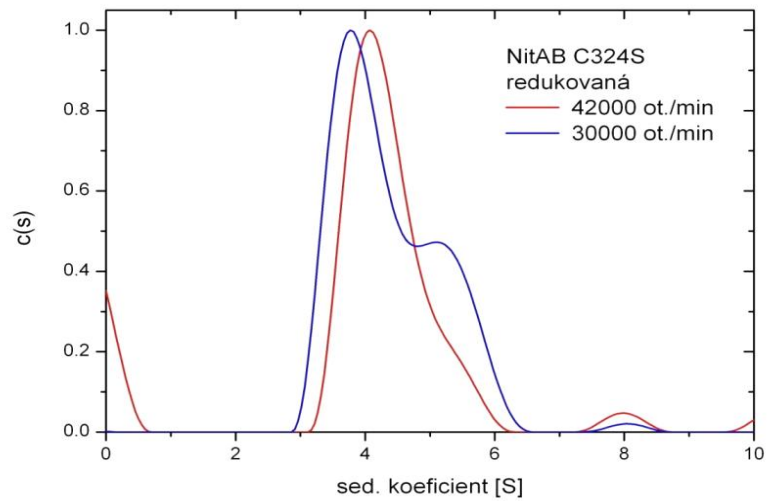
5.3. Sedimentační analýza

Posledním krokem byla sedimentační analýza proteinu pomocí analytické ultracentrifugace. Z naměřených dat vyplývá, že analyzovaný vzorek NitAB C324S tvoří především monomer v dynamické rovnováze s dimerem. Hlavní eluční vrchol z obrázků 9 – 11, s velikostí sedimentačního koeficientu $s_{20,w} = 3,96$ S u nativní a 3,66 S u redukované formy, odpovídá nejlépe rovnováze monomer-dimer. Tento závěr je také ve shodě s daty naměřenými při gelové filtraci. Vyšší oligomery nebyly zjištěny, další eluční vrcholy mající vyšší sedimentační koeficient jsou pravděpodobně způsobeny zbytkovými bakteriálními proteiny. Oproti nativní formě NitAB jde tedy o více homogenní směs tvořenou převážně monomer-dimerem [27].



Obr. 9 a 10: Sedimentační analýza NitAB C324S při 30000 resp.

42000 ot./min. Teoretická hodnota pro monomer je $s_{20,w} = 2,5$ S a pro dimer $s_{20,w} = 4,8$ S. Naměřené hodnoty proto odpovídají dynamické rovnováze monomer-dimer.



Obr. 11: Sedimentační analýza NitAB C324S v redukované formě. Srovnání nativní a redukované formy proteinu. Při nižších otáčkách je vidět u redukované formy více těžšího dimeru.

6. Diskuse

Produkce a následná purifikace mutantní C324S nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* byly primárním cílem této bakalářské práce. Aplikovaný a již optimalizovaný postup produkce i purifikace, použitý na nativní formu této nitrilasy, se ukázal být vhodný i pro tento upravený protein [27].

Při gelové filtraci zakoncentrovaného vzorku lze na obr. 5, str. 25 pozorovat rozdílný retenční objem redukované a neredukované formy. Toto může být způsobeno rozvinutím struktury proteinu v redukujícím prostředí, ze kterého pak plyne kratší doba eluce z kolony. I v případě námi purifikovaného enzymu však bylo pozorováno srážení zakoncentrovaného proteinu v prostředí Tris pufru o $\text{pH} = 8,5$ použitého při gelové chromatografii. Dále po purifikaci mutantní NitAB C324S nitrilasy na této koloně nebyla pozorována v neredukujícím pufru tvorba dimeru (obr. 6, str. 26), jako tomu je u nativní formy tohoto enzymu [27].

Z dat naměřených pomocí analytické ultracentrifugace vyplývá, že NitAB C324S tvoří převážně monomer a dimer v dynamické rovnováze (obr. 11, str. 29). Minoritní eluční vrchol o vyšší hmotě lze připsat zbytkovým bakteriálním proteinům ve vzorku, případně malému podílu vyšších oligomerních forem. Dalším závěrem, který není z vyhodnocení zřejmý, bylo zjištění, že redukovaná forma se oproti neredukované již dále nesráží, a to i při poměrně dlouhých měřeních na AUC (~ 3 dny při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Purifikaci a skladování proteinu by tedy bylo vhodné provádět vždy za použití redukujícího činidla, například TCEP.

Správné uspořádání mutovaného enzymu bude v budoucnu nezbytné ověřit stanovením jeho enzymové aktivity.

7. Závěr

- V bakteriích *E. coli* BL21-Gold (DE3) byla za použití heterologní exprese vyprodukována mutantní varianta nitrilasy z *Arthroderma benhamiae*, která má na C-konci na pozici 324 serin namísto cysteinu.
- Takto připravený protein byl purifikován za použití anexové a gelové permeační chromatografie.
- NitAB C324S tvoří převážně monomer-dimer a to v dynamické rovnováze. Redukce této mutantní nitrilasy nevede k výrazné změně jejího oligomerního stavu, ale zlepšuje stabilitu připraveného enzymu.

8. Seznam použité literatury

- [1] Pace C. Helen a Brenner Charles. „The nitrilase superfamily: classification, structure and function“. *Genome Biology* 2, č. 1 (2001): REVIEWS0001.
- [2] Vejvoda Vojtěch, David Kubáč, Alžběta Davidová, Ondřej Kaplan, Miroslav Šulc, Ondřej Šveda, Radka Chaloupková a Ludmila Martínková. „Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IMI196840“. *Process Biochemistry* 45, č. 7 (2010): 1115–1120.
- [3] Martínková Ludmila, Vojtěch Vejvoda, Ondřej Kaplan, David Kubáč, Anna Malandra, Maria Cantarella, Karel Bezouška a Vladimír Křen. „Fungal nitrilases as biocatalysts: recent developments“. *Biotechnology Advances* 27, č. 6 (2009): 661–670.
- [4] Mark S. Payne, Robert DiCosimo a Daniel P. O'Keefe. „Production of 3-hydroxycarboxylic acid using nitrilase mutants“. Patentová přihláška č. US20100143989 A1.
- [5] Kobayashi Michihiko, Noriyuki Yanaka, Toru Nagasawa a Hideaki Yamada. „Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue“. *Biochemistry* 31, č. 37 (1992): 9000–9007.
- [6] Thimann V. Kenneth a Sundararaman Mahadevan. „Nitrilase“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 105, č. 1 (1964): 133–141.
- [7] Vanneste Steffen a Jiří Friml. „Auxin: a trigger for change in plant development“. *Cell* 136, č. 6 (2009): 1005–1016.
- [8] Kobayashi Michihiko, Toru Nagasawa a Hideaki Yamada. „Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Purification and characterization“. *European Journal of Biochemistry* 182, č. 2 (1989): 349–356.

- [9] Brenner Charles. „Catalysis in the nitrilase superfamily“. *Current Opinion in Structural Biology* 12, č. 6 (2002): 775–782.
- [10] Wang Wen-Ching, Wen-Hwei Hsu, Fan-Tso Chien a Cheng-Yu Chen. „Crystal structure and site-directed mutagenesis studies of N-carbamoyl-D-amino-acid amidohydrolase from *Agrobacterium radiobacter* reveals a homotetramer and insight into a catalytic cleft“. *Journal of Molecular Biology* 306, č. 2 (2001): 251–261.
- [11] Catherine O'Reilly a Peter D. Turner. „The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study“. *Journal of Applied Microbiology* 95, č. 6 (2003): 1161–1174.
- [12] Tek C. Bhalla, Akira Miura, Akiko Wakamoto, Yoichi Ohba a Keizo Furuhashi. „Asymmetric hydrolysis of alpha-aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34“. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, č. 2 (1992): 184–190.
- [13] Takahisa Nakai, Tomokazu Hasegawa, Eiki Yamashita, Masaki Yamamoto, Takashi Kumasaka, Tatzuo Ueki, Hirokazu Nanba, Yasuhiro Ikenaka, Satomi Takahashi, Mamoru Sato a Tomitake Tsukihara. „Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases“. *Structure* 8, č. 7 (2000): 729–738.
- [14] Kobayashi Michihiko, Hiroshi Izui, Toru Nagasawa a Hideaki Yamada. „Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, č. 1 (1993): 247–251.
- [15] Dan E. Robertson, Jennifer A. Chaplin, Grace DeSantis, Mircea Podar, Mark Madden, Ellen Chi, Toby Richardson, Aileen Milan, Mark Miller, David P. Weiner, Kelvin Wong, Jeff McQuaid, Bob Farwell, Lori A. Preston, Xuqiu Tan, Marjory A. Snead, Martin Keller, Eric Mathur, Patricia L. Kretz, Mark J. Burk a Jay M. Short. „Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis“. *Applied and Environmental Microbiology* 70, č. 4 (2004): 2429–2436.

- [16] Mircea Podar, Jonathan R. Eads a Toby H. Richardson. „Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study“. *BMC Evolutionary Biology* 5 (2005): ARTN 42.
- [17] *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton mentagrophytes*). UniProt Taxonomy. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/taxonomy/63400> [cit. 2014-08-06].
- [18] Anke Burmester, Ekaterina Shelest, Gernot Glöckner, Christoph Heddergott, Susann Schindler, Peter Staib, Andrew Heide, Marius Felder, Andreas Petzold, Karol Szafranski, Marc Feuermann, Ivo Pedruzzi, Steffen Priebe, Marco Groth, Robert Winkler, Wenjun Li, Olaf Kniemeyer, Volker Schroeckh, Christian Hertweck, Bernhard Hube, Theodore C. White, Matthias Platzer, Reinhard Guthke, Joseph Heitman, Johannes Wöstemeyer, Peter F. Zipfel, Michel Monod a Axel A. Brakhage. „Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi“. *Genome Biology* 12, č. 1 (2011): R7.
- [19] Stephen H. Gillespie a Kathleen B. Bamford. „Medical microbiology and infection at a glance“. 2. vydání, Oxford, Blackwell Publishing, 2003.
- [20] Don Liu, Susan Coloe, Robert W. Baird a John Pedersen. „PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer“. *Journal of Medical Microbiology* 46, č. 12 (1997): 1043–1046.
- [21] Peter Staib, Christophe Zaugg, Bernard Mignon, Johann Weber, Maria Grumbt, Sylvain Pradervand, Keith Harshman a Michel Monod. „Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection“. *Microbiology* 156, č. 3 (2010): 884–895.
- [22] Karin L. Heckman a Larry R. Pease. „Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension“. *Nature Protocols* 2, č. 4 (2007): 924–932.
- [23] Ondřej Vaněk a Karel Bezouška. „Analytická ultracentrifuga a její využití v biochemické laboratoři“. *Chemické Listy* 104 (2010): 1155–1162.

[24] Program SENDTERP. Dostupné z:
<http://www.jphilo.mailway.com/default.htm> [cit. 2014-08-06].

[25] Peter Schuck. „Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling“. *Biophysical Journal* 78, č. 3 (2000): 1606–1619.

[26] Peter Schuck. „On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation“. *Analytical Biochemistry* 320, č. 1 (2003): 104–124.

[27] Iveta Hradilová. „Příprava a studium vlastností kyanidhydratasy z *Aspergillus niger* a nitrilasy z *Arthroderma benhamiae*“. Diplomová práce, Katedra biochemie PřF UK Praha (2014).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka